

Aus dem Physiologischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktoren: Prof. Dr. K.J. Ullrich Prof. Dr. O.H. Gauer

Über eine Mikromethode zur
Bestimmung von Metaboliten im
Muskelgewebe

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1968

vorgelegt von
Ralf Zwiebel
aus Berlin

Aus dem Physiologischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktoren: Prof. Dr. K.J. Ullrich Prof. Dr. O.H. Gauer

Über eine Mikromethode zur
Bestimmung von Metaboliten im
Muskelgewebe

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ralf Zwiebel
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Hans Wolfgang Spier

Referent: Prof. Dr. med. Karl-Julius Ullrich

Korreferent: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Dulce



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19.2.1968

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	3
Beschreibung der Methode	5
I. Vorbereitung der Versuchstiere (Ratten) und Entnahme von Muskelproben aus der Bauchmuskulatur	5
II. Aufschluß des Gewebes	5
III. Metabolitanalyse	14
Ergebnisse	38
Diskussion	40
Zusammenfassung	43
Literaturverzeichnis	44

Einleitung

Um den Zellstoffwechsel im Muskelgewebe und funktionelle Veränderungen desselben zu erfassen, ist die Bestimmung der Metabolite notwendig. Bei der Aufarbeitung von Gewebeproben wird gewöhnlich der Metabolitgehalt in nicht genau bestimmbarem Ausmaß verändert. Dies geschieht einmal dadurch, daß die Stoffwechselprozesse bis zum Gefrierstop weiterlaufen und außerdem säureempfindliche Metabolite bei der unvermeidlichen Säureextraktion zerstört werden.

Im Folgenden wird eine Methode beschrieben, die die bisherigen Methoden zur Gewebsaufschließung verbessert, so daß Veränderungen des in-vivo-Status vermindert, wenn nicht ganz vermieden werden. Diese Methode bietet außerdem noch zwei wichtige Vorteile: Erstens, daß Mikromengen von 30 - 40 mg Gewebe für die Analyse von mehreren Metaboliten (im angeführten Analysebeispiel 15) ausreichen und zweitens, daß die Zusammensetzung des Gewebes mikroskopisch kontrolliert und dabei unerwünschte Gewebelemente wie Fett, Bindegewebe und Gefäße entfernt werden können.



Abb. 1: Kryostat der Fa. Dittes, welcher in der Kühlkammer das Mikrotom der Fa. Jung enthält. Die beiden seitlichen Öffnungen sind zum Einführen der Hände angebracht.

Beschreibung der Methode

I. Vorbereitung der Versuchstiere (Ratten) und Entnahme von Muskelproben aus der Bauchmuskulatur. Hierbei wurde in den Grundzügen das von Hohorst angegebene Vorgehen übernommen (8). Männliche und weibliche Wistarratten mit einem Gewicht von 150 - 220 g wurden eine Stunde vor dem Versuch von dem Kollektiv getrennt und in kleine Laborkäfige gebracht, in denen sie nicht mehr umherlaufen konnten. Als Narkotikum wurde abweichend von Hohorst statt Äther Inactin^R (5-Aethyl-5-(1-Methyl-propyl)-2-thiobarbitursäure) benutzt. Die Tiere schliefen nach intraperitonealer Injektion innerhalb weniger Minuten ein und wurden dann auf einen kleinen Operationstisch geschnallt und zur Vermeidung einer Auskühlung mit einer 25 W starken Lampe angetrahlt. Nachdem ungefähr 15 - 20 Minuten seit Injektion des Narkotikums vergangen waren, wurde die Bauchhaut von einem Medianschnitt ausgehend mit einem scharfen Skalpell unter größter Schonung der darunterliegenden Muskulatur abgelöst. Dann wurde ebenfalls in der Medianlinie die Bauchmuskulatur in der Linea alba mit einer feinen Schere durchgeschnitten und dabei die Bauchhöhle eröffnet. Die nun freiliegende Muskulatur wurde mit 2 Pinzetten vorsichtig angehoben und zwischen 2 mit flüssigem Stickstoff gekühlten zangenartigen Blöcken gepreßt. Das damit erfaßte Gewebe wurde rasch von dem übrigen Bauchmuskulargewebe getrennt und in flüssigen Stickstoff gebracht.

II. Aufschluß des Gewebes⁺

Das Gewebe, welches durch die Einwirkung des flüssigen Stickstoffs steinhart gefroren und durch den Druck der Metallblöcke flach und platt war, wurde zur weiteren Verarbeitung in kleine Stückchen gebrochen. Eines dieser Stückchen wurde auf die mit wenig eisgekühlter Flüssigkeit benetzte Gefrierkammer gelegt und im gleichen Moment die Kammer mit flüssiger Kohlensäure unterkühlt, so daß das Gewebe anfror. Dabei wurde außerdem noch ein gekühlter Metallblock schützend auf das



Abb. 2: Rechts oben ist die auf einen Sockel aufdrehbare Gefrierkammer zu sehen, links die Flasche mit flüssiger CO_2 , dazwischen eine Verbindungsleitung. Ist das Gewebestück auf die Gefrierkammer gelegt, so kann durch Betätigung des rechten Knopfes die Gefrierkammer in kürzester Zeit unterkühlt werden.

Gewebe gelegt. Anschließend wurde die Gefrierkammer in den Kryostaten gebracht und dort in das Mikrotom eingeschraubt. Die Temperatur im Kryostaten betrug ungefähr -26 bis -28°C und stieg während der weiteren Aufarbeitung um $1 - 2^{\circ}\text{C}$ an.

Ohne Verzug wurden nun Schnitte von $10 - 20$ Dicke angefertigt. Die ersten Schnitte, die Fascie und Fett enthielten, wurden verworfen. Nachdem 20 bis 40 Schnitte zusammengekommen waren, wurden diese mit Hilfe zweier Trovidurstäbe zu einem Kügelchen zusammengepreßt und dieses in ein Polyäthylengefäß gebracht, welches seinerseits in flüssiger Luft versenkt wurde (siehe Abb. 4).

Die Wägung erfolgte mit Hilfe einer Mikrowaage in einem Kühlraum von ungefähr 1 bis 2°C . Mit einiger Übung gelang es, die Wägung innerhalb weniger Sekunden durchzuführen, so daß das Gewebe bis zur Überführung in kleine Polyäthylengefäße in tiefgefrorenem Zustand verblieb und eine Kondensierung von Wasser, wie Überprüfung des Trockengewichtes ergaben, vernachlässigbar waren (siehe Tabelle I). Der weitere Aufschluß des etwa 20 bis 30 mg wiegenden Gewebes wurde in diesen Polyäthylengefäßen, die in ein Kochsalz-Eis-Gemisch gebracht auf einer Temperatur von -15°C gehalten wurden, fortgeführt. Nach Überführung des Gewebes in diese Gefäße wurde $0,4$ ml $0,6$ N HClO_4 zupipettiert. Der Inhalt fror zu einer gelatinösen Masse. Wir beschallten dann 15 Sekunden, machten eine Pause von 30 Sekunden und beschallten dann nochmals 15 Sekunden. Dabei stieg die Temperatur, wie Abb. 7 zeigt, während der Beschallung von -15°C auf ungefähr -10°C an, fiel in der Pause wieder auf -14°C und stieg bei der zweiten Beschallung auf -9°C . Nach dieser Prozedur war das Gewebe makroskopisch zerstört. Im Geweberückstand fanden sich jedoch noch kleine Stückchen, die eine Querstreifung zeigten, was auf eine ungenügende Zerkleinerung hinweist. Deshalb wurde nach der ersten Beschallung 60 Sekunden lang zentrifugiert, der Rückstand in $0,2$ ml $0,6$ N HClO_4 aufgenommen und dieser noch einmal 15 Sekunden lang beschallt.

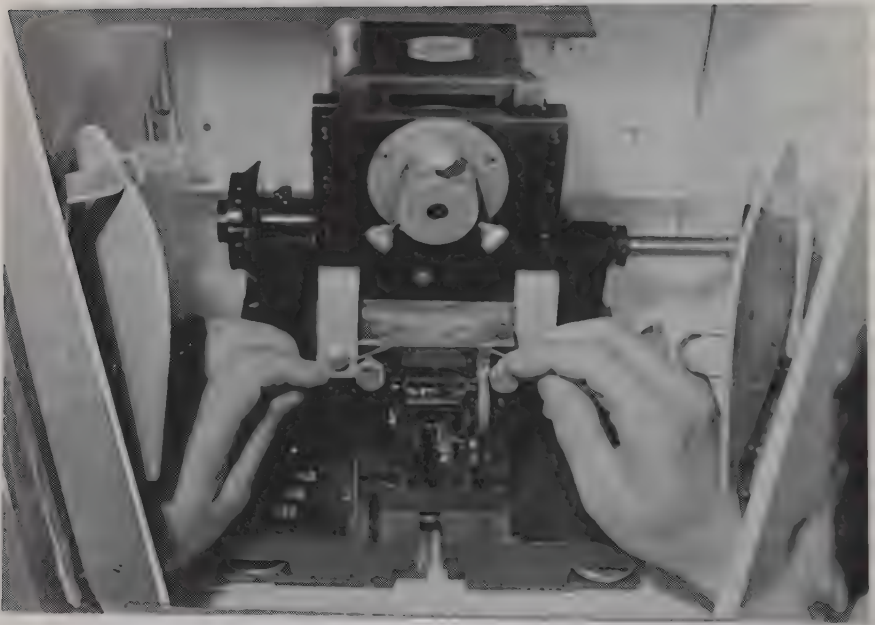


Abb. 3: Das Bild zeigt das Innere des Kryostaten.
Ein kleines Klümpchen von Gewebe wird mit
Hilfe zweier Troidurstäbe angefertigt.



Abb. 4: Transportgefäß: Das Dewargefäß enthält bis fast zum Rand flüssigen Stickstoff, in welchen die oben aufgehängten Polyäthylengefäße durch Einsenken getaucht werden können.

Nach diesem zweiten Aufschluß waren im mikroskopischen Ausstrich nur noch homogene Bänder sichtbar. Der Überstand wurde jedesmal in Polyäthylengefäße pipettiert, die bereits 0,2 ml 2 N K_2CO_3 in 0,5 N TRA-Puffer enthielten. Das sofortige Neutralisieren des Überstandes dürfte den Zerfall der säurelabilen Metabolite gering halten. Die Kapazität des Puffers reichte aus, um die Lösung bei pH 7 zu halten.

Um zu prüfen, ob bei dem bisherigen Verfahren Metabolite zerstört wurden, wurde folgender Versuch unternommen: An Stelle von Gewebe wurde eine Metabolitlösung beschallt und neutralisiert und die Konzentration anschließend gemessen. Wie die Tabelle II an Hand von zwei Testen für Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat zeigt, liegt die Wiedergewinnung im Bereich des Fehlerbereiches $\pm 5\%$. In einem zweiten Kontrollversuch wurde dem aufzuschließenden Gewebe eine bekannte Metabolitlösung zugegeben. Auch hier lag die Differenz im $\pm 5\%$ -Bereich.

Nachdem die Kohlensäure, die durch die Neutralisation der $HClO_4$ mit der Pufferlösung gebildet wurde, abgeraucht war, wurde nochmals eine Minute lang zentrifugiert und der so gewonnene Überstand abpipettiert und gewogen.

Der Verdünnungsfaktor errechnete sich aus:

$$\frac{\text{Endvolumen des Extraktes}}{\text{Frischgewicht des Gewebes}} \cdot$$

Der Faktor betrug meist zwischen 20 und 40.

Der Extrakt wurde nun sofort zur Metabolitanalyse verwendet.

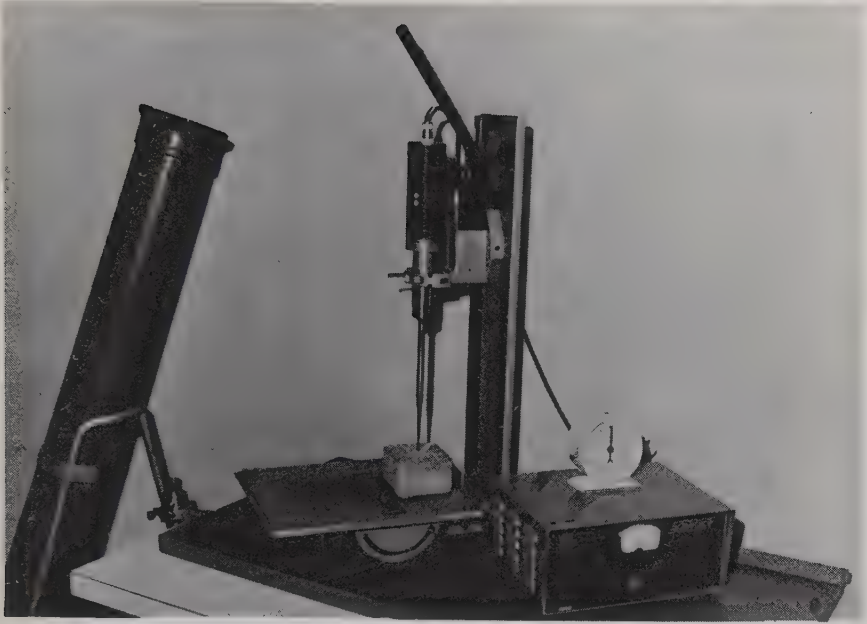


Abb. 5: Das Bild zeigt das Ultraschallgerät der Fa. Branson. Der Schallkopf mit der Arbeitsspitze ist mit einem Hebel verbunden, wodurch diese in das Polyäthylengefäß gesenkt werden kann. Die Spitze zeigt auf das Eis-Salz-Gefäß. Rechts ist der Generator des Gerätes zu sehen.

TABELLE 1

	A	B	C	D
Gewicht 1	21.4693	26.2416	21.5733	23.4488
Gewicht 2	22.4664	26.7488	21.6101	23.4716
Gewebe	0.9971	0.5072	0.0328	0.0234
Gewicht 3	21.7166	26.3637	21.5852	23.4548
Trockengewicht in % :	24.8	24.0	24.0	25.5

Tabelle I: Kontrolle des Wassergehaltes während der Aufschluß-
prozedur: Alle Angaben in g. Gewicht 1 = ohne Gewebe;
Gewicht 2 = Feuchtgewicht; Gewicht 3 = Trockenge-
wicht nach 24 Std. 110°C.

Die Kontrolle erfolgte bis zur Gewichtskonstanz.

A₃ = Trockengewicht ohne Frierstop, B₃ = Trocken-
gewicht bei normalem Frierstop, C₃ = Trockengewicht
nach Anfertigung der Schnitte, D₃ = Trockengewicht
nach vollständiger Transportprozedur.

(Auszug aus dem Protokoll vom 12.8.65)

⁺Zubehör:

1. Ein Kryostat der Fa. LINDE, Heidelberg, mit einem Mikrotom der Fa. JUNG, Heidelberg.
2. Eine Vorrichtung zum Anfrieren mittels flüssiger und gereinigter Kohlensäure (siehe Abb. 2).
3. Eine Mikrowaage der Fa. SAUTER.
4. Ein Ultraschallgerät der Fa. BRANSON, USA, Typ Sonifier (siehe Abb. 5).
5. Eine Mikrozentrifuge der Fa. EPPENDORF, Hamburg.
Umdrehungen: 18000/Minute (siehe Abb. 6).
6. Automatische Pipetten der Fa. NETHELER, Typ Marburg.
7. Außerdem Pipettenspitzen, Polyäthylengefäße, Pinzetten, Trovidurstäbe und ein besonderes Transportgefäß (siehe Abb. 4).

III. Metabolitanalyse:

In dem so gewonnenen Extrakt werden folgende Metabolite bestimmt: Glucose, Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Creatinphosphat (CP), Glucose-6-phosphat (G6P), Glucose-1-phosphat (G1P), Fructose-6-phosphat (F6P), Fructose-1,6-diphosphat (FDP), Dihydroxyacetonphosphat (DAP), Lactat (L), Pyruvat (PY). Außerdem wurden noch Tests zur Bestimmung von Malat (M), Glycerophosphat (G) und Adenosinmonophosphat (AMP) ausgearbeitet.

Die in den letzten Jahren erarbeiteten optisch-enzymatischen Tests zur Bestimmung von Metaboliten und Enzymaktivitäten haben eine weite Verbreitung gefunden (2,8,9). Der besondere Vorteil dieser Methoden liegt in ihrer großen Empfindlichkeit. Durch die Einführung fluometrischer Technik in die optisch-enzymatische Analyse von Metaboliten und Enzymen (5,10,11,12,13,19) ist diese Empfindlichkeit noch weiter gesteigert worden. Da nach Anwendung der beschriebenen Methode nur geringe Extraktmengen zur Verfügung standen, haben wir die fluometrische Technik gewählt.

Für die einzelnen Tests wurden benutzt:

1. Photometer Eppendorf mit Fluoreszenzzusatzgerät.
2. Primärfilter 313, 366 der Fa. Eppendorf, welches nur Lichtstrahlen der angegebenen Wellenlängen durchläßt.
3. Sekundärfilter 420-3000 der Fa. Eppendorf, welches nur Lichtstrahlen der Wellenlängen über 420 m μ durchläßt.
4. Registrieradapter
5. 1-cm-Küvetten der Fa. Hellma
6. Mikroküvetten: Sonderanfertigung der Fa. Hellma. Die Küvetten sind aus Quarz und haben folgende Maße: 2 mm tief, 2,5 cm hoch. Das Maximalvolumen beträgt 330 μ l.
7. Nethelerpipetten, Typ Marburg, mit Plastikpipettenspitzen.
8. Geeichte Hamilton-Mikropipette, 1-10 μ l.
9. Eisbad für die einzelnen Lösungen sowie Rührer aus Trovidur.

TABELLE II

TEST 1	TEST 2
0.046 ml G6P= 5.7 nM	0.010 ml FdP 10 nM
0.4 ml HClO_4	0.4 ml HClO_4
30 Sekunden Ultraschall	30 Sekunden Ultraschall
30 Sekunden Zentrifugieren	30 Sekunden Zentrifugieren
0.1 ml Puffer	0.1 ml Puffer
0.1 ml HClO_4	0.1 ml HClO_4
30 Sekunden Ultraschall	30 Sekunden Ultraschall
30 Sekunden Zentrifugieren	30 Sekunden Zentrifugieren
Endvolumen: 0.66 ml	Endvolumen: 0.66 ml
Fluorometrietest: 105%	Fluorometrietest: 95.5%

Tabelle II: Auszug aus dem Protokollheft vom 11.8.65:

Das Vorgehen ist nur stichwortartig wiedergegeben.

Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen.



Abb. 6: Die Mikrozentrifuge der Fa. Eppendorf, Hamburg.
Zahl der Umdrehungen pro Minute: 18 000.

Wie die optisch-enzymatischen Tests nach O. Warburg, sind die Tests auf dem unterschiedlichen Absorptionsverhalten sowie der daraus resultierenden Fluoreszenz der Pyridinnukleotide aufgebaut: Dihydrophosphopyridinnukleotid (DPNH, NADH) und Trihydrophosphopyridinnukleotid (TPNH, NADPH) zeigen bei Bestrahlung mit ultravioletter Wellenlänge Absorption und eine der Absorption proportionale Fluoreszenz im Wellenbereich von 420 $m\mu$. Diphosphopyridinnukleotid (DPN, NAD) und Triphosphopyridinnukleotid (TPN, NADP) absorbieren und fluoreszieren nicht. Die bei Bergmeyer (2) ausführlich beschriebenen Tests mit Cofermenten und Enzymen sind für fluometrische Methoden umgewandelt worden. Da kein Fluoreszenzkoeffizient besteht, existieren grundsätzlich zwei Möglichkeiten, Konzentrationsbestimmungen von Metaboliten mittels Fluorometrie auszuführen. Entweder kann eine Eichgerade aufgestellt werden, oder es kann nach Ablauf der enzymatischen Reaktion eine bekannte Menge des zu bestimmenden Metaboliten hinzugegeben werden. Für jeden Metabolitbestimmungstest wurde eine Eichgerade aufgestellt. Hierzu wurde eine geringe Menge des Metaboliten an einer Mikrowaage abgewogen und die Konzentration der Lösung am Photometer bestimmt. Anschließend wurden mit unterschiedlichen Metabolitmengen fluometrische Tests ausgeführt.

Die erzielten Fluoreszenzwerte wurden gegen die Konzentration der Metabolite aufgetragen und ergaben eine Gerade. Diese Eichgerade zeigt, ob die Reaktion quantitativ abläuft und ob die Testmischung die optimale Zusammensetzung enthält. Dann wurden die Tests mit Extrakt erprobt, wobei die Eichgeraden keine Verwendung mehr fanden. Es wurde nach Ablauf der enzymatischen Reaktion eine bekannte Menge des zu bestimmenden Metaboliten hinzupipettiert, dessen Fluoreszenzwert mit dem des Extraktes verglichen und nach einer einfachen Formel die Metabolitkonzentration errechnet wurde (sogenannter "innerer Standard").

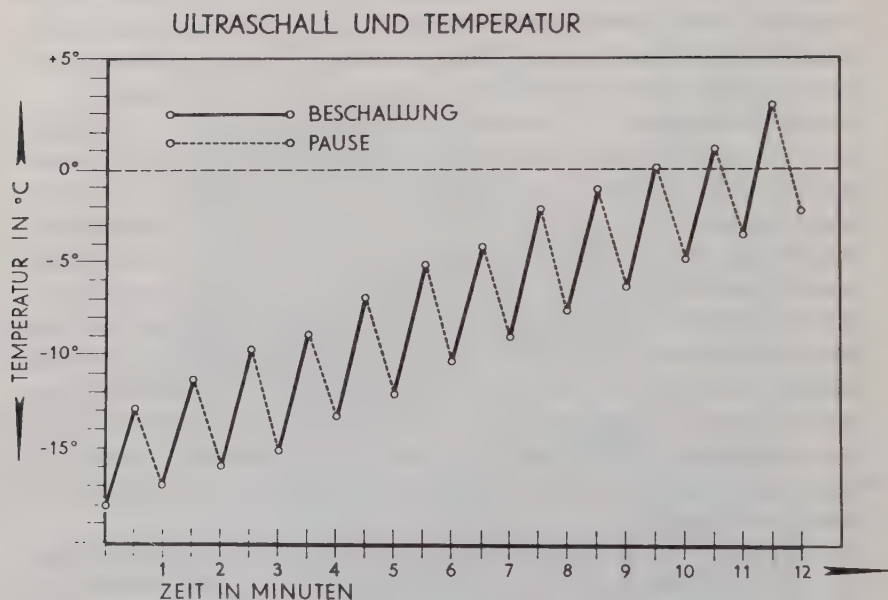


Abb. 7: Temperaturverlauf während Ultraschallbehandlung.
Das Polyäthylengefäß enthält 0,6 ml 0,6 N HClO_4 .
Die Schalldauer beträgt 30 Sekunden, ebenso die
Pause zwischen zwei Beschallungen. Die Registrie-
rung der Temperatur erfolgte alle 30 Sekunden.

GLUCOSE-6-PHOSPHAT (G6P) ^{1:}

Reaktionsablauf:



Reagenzien:

- b. NADP (TPN-Na 15 300 Boehringer) : 10 mg/ml
TRA-Puffer aus Triäthanoamin-hydrochlorid (Merck);
18,57 g auf 1 l Aqua bid., mit 2 N NaOH auf pH 7.6
D-Glucose-6-phosphate: NADP oxidoreductase (1.1.1.94),
G6PD 15 303 B = 5 mg = ml : 1 : 10 verdünnt.
G6P (G6P-Na 15 307 B)

Metabolitbestimmung am Photometer:

- c. 0.05 NADP, 0.1 G6P, 1.0 TRAP, Start: 0.02 G6PD
Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$C = \frac{\Delta E \cdot V_1}{\epsilon \cdot V_2}$$

ΔE = Extinktionsdifferenz

V_1 = Gesamtvolumen

V_2 = Substratvolumen

ϵ = Extinktionskoeffizient

C = Konzentration

Bestimmung der Eichgeraden:

- d. Comix: 0.01 NADP, 1.4 TRAP
Eichansatz: 0.3 Comix, 0.005 G6PD; dann Zugabe von unterschiedlichen G6P-Mengen.

1: Besondere Bemerkungen:

1. Die Enzymnomenklatur ist dem "Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry" entnommen.
2. Alle Mengenangaben ohne Bezeichnung sind als ml zu verstehen.
3. Alle Enzyme und Substrate sind, falls nicht anders angegeben, in Aqua bid. gelöst.
4. B ist die Abkürzung für Boehringer.

Metabolitbestimmung im Extrakt:

e. Comix; siehe d.

Meßansatz: 0.1 Extrakt, 0.2 Comix, Start: 0.005 G6PD. Als Eichung wird anschließend eine bekannte Menge G6P hinzugegeben. Die Berechnung, die für alle folgenden Teste gilt, erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\Delta T_E \cdot c_S \cdot F}{\Delta T_S \cdot V}$$

ΔT_E = Transmissionsdifferenz

c_S = Konzentration des Metaboliten

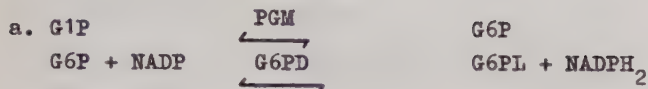
F = Verdünnungsfaktor

ΔT_S = Transmissionsdifferenz des zugegebenen Substrates

V = Gesamtvolumen

GLUCOSE-1-PHOSPHAT (G1P)

Reaktionsablauf:



Reagenzien:

- b. alpha-D-Glucose-1, 6-diphosphate: alpha-D-Glucose-1-phosphate phosphotransferase (2.7.5.1)
PGM 15 340 B = 10 mg/ml ; 1 : 5 verdünnt.
G1P (G1P-Na 15 323 B)
NADP und TRA-Puffer siehe G6P-Test.

Metabolitbestimmung am Photometer:

- c. 0.05 NADP, 0.1 G1P, 1.0 TRAP, 0.02 G6PD; Start mit 0.02 PGM.
Berechnung siehe G6P-Test.

Bestimmung der Eichgeraden:

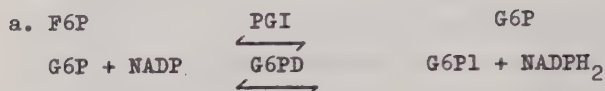
- d. Comix: siehe G6P-Test
Eichansatz: 0.3 Comix, 0.005 G6PD und 0.005 PGM.
Dann Zugabe von unterschiedlichen G1P-Mengen.

Metabolitbestimmung im Extrakt:

- e. Meßansatz: 0.1 Extrakt, 0.2 Comix, 0.005 G6PD. Start mit 0.005 PGM. Berechnung siehe G6P-Test. Die Reaktion verläuft sehr langsam, in der Regel etwa 15 Minuten.

FRUCTOSE-6-PHOSPHAT (F6P)

Reaktionsablauf:



Reagenzien:

b. D-Glucose-6-phosphate Ketol-isomerase (5.3.1.9.)

PGI 15 433 B = 2 mg/ml : 1 : 5 verdünnt.

F6P (F6P-Ba 15 148)

im übrigen die gleichen Reagenzien wie bei G6P.

Metabolitbestimmung am Photometer:

c. 0.05 NADP, 0.1 F6P, 1.0 TRAP, 0.02 G6PD. Start mit 0.02 PGI.
Berechnung: G6P-Test.

Bestimmung der Eichgeraden:

d. Comix: siehe G6P-Test

Eichansatz: 0.3 Comix, 0.005 G6PD, 0.005 PGI.

Anschließend Gabe von unterschiedlichen F6P-Mengen.

Metabolitbestimmung im Extrakt:

e. Comix: siehe d.

Meßansatz: 0.1 Extrakt, 0.2 Comix, 0.005 G6PD. Start mit 0.005 PGI. Dann Zugabe von F6P, innerer Standard. Berechnung: G6P-Test.

Zu der Bestimmung von G1P und F6P ist zu sagen, daß diese Metabolite in der Regel nach der Bestimmung von G6P in der gleichen Küvette bestimmt wurden. Da die gleichen Konzentrationen von G6P und G1P und F6P die gleichen Transmissionswerte am Fluorometer ergeben, genügt es für einen Test vollständig, wenn mit einer Eichsubstanz der innere Standard bestimmt wird.

ADENOSINTRIPHOSPHAT (ATP) und CREATINPHOSPHAT (CP)

Reaktionsablauf:



Das dem CP entsprechende äquimolar entstehende ATP kann über die Hexokinasereaktion bestimmt werden.

Reagenzien:

b. NADP: siehe G6P-Test

D-Glucose (Serva, Heidelberg) : 5 g / 20 ml
MgCl₂ (Merck, Darmstadt) : 66 mg/ml
Adenosindiphosphat (ADP 15 014 B = 10 mg/ml)
Adenosintriphosphat (ATP 15 028 B = 1 g)
Creatinphosphat (CP-Na 15 402B= 100 mg)
ATP: D-Hexose-6-phospho-transferase (2.7.1.1)
HK 15 303 B = 10 mg/ml : 1 : 10 verdünnt.
ATP creatine phosphotransferase
CPK 15 334 B in Substanz: 20 mg/ml Glycinpuffer ph 9.2

Metabolitbestimmung am Photometer:

c. 0.02 MgCl₂, 0.02 Glucose, 0.02 NADP, 0.1 ATP, 0.1 CP und 0.8 TRAP. Zugabe von 0.02 G6PD. Bestimmung von ATP: 0.02 HK. Nach Ablauf der Reaktion: 0.005 ADP. Da ADP geringe Spuren von ATP enthält, muß die Extinktionsänderung abgewartet werden. Bestimmung von CP: 0.02 CPK.

Bestimmung der Eichgeraden:

d. Comix: 0.01 MgCl₂, 0.01 Glucose, 0.01 NADP, 1.4 TRAP.
Eichansatz: 0.27 Comix, 0.005 ATP, 0.005 CP. Dann jeweils 0.005 G6PD, HK, ADP und CPK.

Metabolitbestimmung im Extrakt:

e. Comix: siehe d.

Meßansatz: Obwohl, wie Abb. 8 zeigt, ATP und CP prinzipiell in einem Test gemessen werden können, ergeben sich bei der

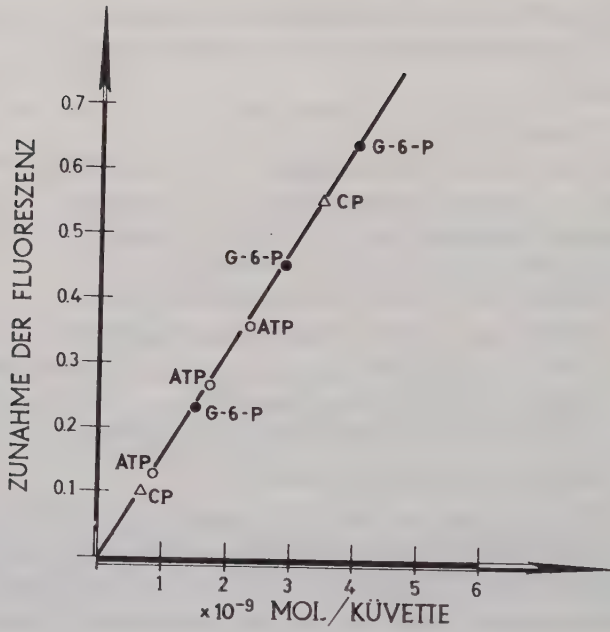


Abb. 8: Eichgerade des kombinierten Testes für G6P, ATP und CP. Testzusammensetzung siehe S. 23.

Analyse von Muskelgewebe einige Schwierigkeiten. Besonders erschwerend ist, daß CP in mindestens 4mal höherer Konzentration im Gewebe vorliegt als ATP, so daß bei der Wahl großer Extraktmengen der Ausschlag der Transmission für CP zu groß wird, bei der Wahl kleiner Extraktmengen der Ausschlag für ATP zu klein wird. Aus diesem Grund messen wir ATP und CP getrennt.

Für ATP: 0.01 Extrakt, 0.28 Comix. Start: 0.005 G6PD und 0.005 HK. Innerer Standard mit ATP oder G6P.

Für CP: 0.005 Extrakt, 0.28 Comix. Start: jeweils 0.005 G6PD, HK, ADP und CPK. Innerer Standard mit ATP oder CP. Berechnung erfolgt wie früher angegeben.

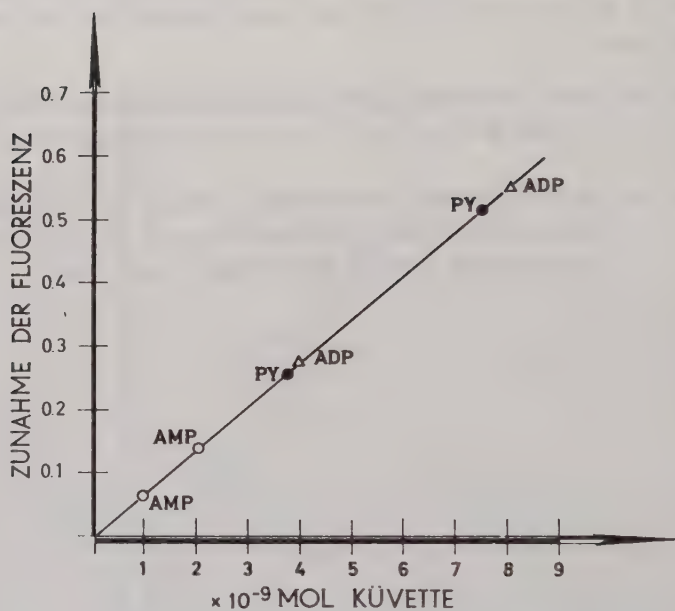
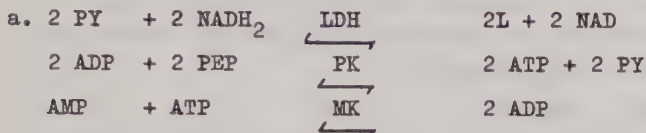


Abb. 9: Eichgerade des kombinierten Testes für PY, ADP und AMP.
Testzusammensetzung siehe Seite 28.

PYRUVAT (PY), ADENOSINDIPHOSPHAT (ADP) und ADENOSINMONO-
PHOSPHAT (AMP)

Reaktionsablauf:



Reagenzien:

- b. NADH₂ (DPNH 15 142 B) : 10 mg/ 4 ml TRAP
MgCl₂, TRAP siehe frühere Teste
Phosphoenolpyruvat (PEP-C 15 308) B : 20 mg/ml
ATP: siehe ATP-Test
KCl (Merck, Darmstadt) : 14,9 g ad 100
l-lactate: NAD oxidoreductase (1.1.1.27)
LDH 15 145 B = 25 mg/5 ml : 1 : 2 verdünnt
ATP pyruvat phosphotransferase (2.7.1.40)
PK 15 744 B = 10 mg/ml : 1 : 1 verdünnt
ATP:AMP phosphotransferase (2.7.4.3)
MK 15 355 B = 5 mg/ml : 1 : 10 verdünnt
Pyruvat-Na (PY-Na 15 685 B)
AMP (A-5-MP-Na 15 015 B)
ADP siehe ATP-Test.

Metabolitbestimmung am Photometer:

- c. 0.01 MgCl₂, 0.05 KCl, 0.05 ATP, 0.05 PEP, 0.05 NADH₂,
0.05 PY, 0.05 ADP, 0.05 AMP und 0.9 TRAP.
Pyruvatbestimmung: 0.01 LDH
ADP-Bestimmung: 0.005 PK
AMP-Bestimmung: 0.01 MK

Bei diesem Test muß ein Blindwert bestimmt werden, da NADH₂
immer etwas AMP, ATP etwas ADP und PEP etwas Pyruvat ent-
hält. Man gibt an Stelle der Substrate lediglich Aqua bid.
Berechnung siehe früher.

Bestimmung der Eichgeraden:

- d. Comix: 0.01 MgCl₂, 0.01 KCl, 0.01 ATP, 0.02 PEP, 0.025 NADH₂
und 1.0 TRAP.

Eichmix: 0.05 PY, 0.05 ADP und 0.05 AMP.

Eichansatz: 0.25 Comix, 0.02 Eichmix, jeweils 0.005 LDH, PK und MK. Auch hier muß wieder ein Blindwert bestimmt werden. Alle erhaltenen Transmissionswerte liegen auf einer Geraden, wenn berücksichtigt wird, daß 1 Mol AMP einem Ausschlag von 2 Mol NADH_2 entspricht.

Metabolitbestimmung im Extrakt:

- e. Da die Metabolitkonzentrationen der Substrate ADP und AMP bzw. PY in erheblich unterschiedlichen Konzentrationen im Muskelgewebe vorliegen, muß man auch hier PY und ADP getrennt messen.

Für PY: 0.15 Comix, 0.15 Extrakt, 0.005 LDH.

Eichung mit PY. Für die Extraktanalyse ist ein einfacher Comix zu verwenden, d.h. auf die Zugabe von ATP, MgCl_2 und KCl kann verzichtet werden.

Für ADP: 0.05 Extrakt, 0.25 Comix, 0.005 LDH.

Nachdem die Reaktion für PY abgelaufen ist, wird 0.005 PEP hinzugegeben. Hier muß eine kleine Transmissionsänderung abgewartet werden, da PEP geringe Spuren von PY enthält. Anschließend Start mit 0.005 PK.

Für AMP: Vorgehen wie bei ADP. Nach Ablauf der ADP-Reaktion Zugabe von 0.005 MK. Hier muß wieder ein Blindwert bestimmt werden, indem für den Extrakt 0.05 Aqua bid. eingesetzt werden. Berechnung wie früher.

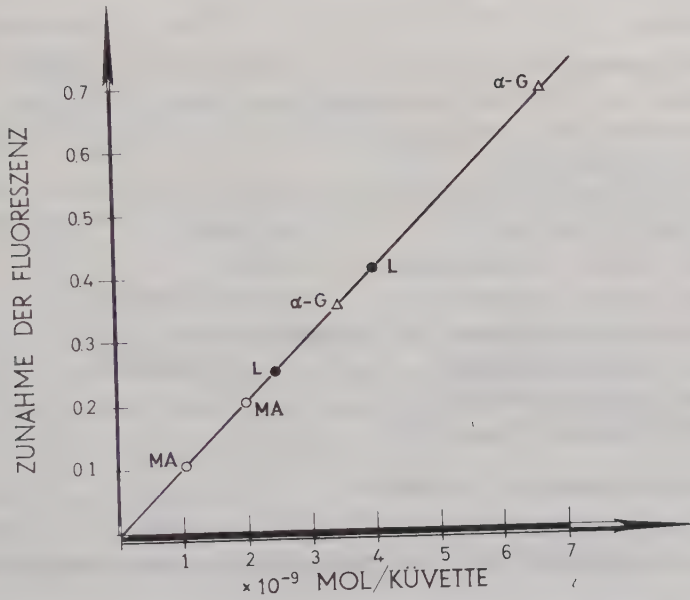
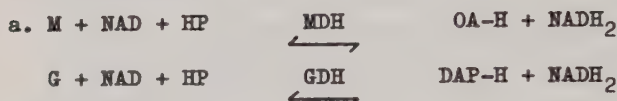


Abb. 10: Eichgerade für die Bestimmung von M, G und L.

GLYCEROPHOSPHAT (G) und MALAT (M)⁺

Reaktionsablauf:



Reagenzien:

- b. Hydrazin-Glycin-Puffer (HP): 7.5 g Glycin, 5.2 g Hydrazinsulfat, 0.2 g EDTA in wenig Aqua bid. lösen, dann 51 ml 2 N NaOH zugeben. Schließlich auf 100 ml mit Aqua bid. auffüllen. Ph-Wert 9,5.

(Die Substrate sind von der Fa. Merck bezogen).

NAD (DPN 15 300 B) : 40 mg/ml

l-malate: NAD oxidoreductase (1.1.1.37)

MDH 15 048 B = 25 mg/2.5 ml : 1 : 2 verdünnt

l-glycerol-3-phosphate: NAD oxidoreductase (1.1.1.8)

GDH 15 135 B = 10 mg/ml : 1 : 20 verdünnt

Malat (Serva, Heidelberg)

Glycerophosphat (Sigma, USA)

Metabolitbestimmung am Photometer:

- c. 0.05 NAD, 0.05 M, 0.05 G, 0.5 HP, 0.5 Aqua bid.

Malat-Bestimmung: 0.01 MDH. Glycerophosphatbestimmung: 0.01 GDH.

Bestimmung der Eichgeraden:

- d. Comix: 0.01 NAD, 0.5 HP, 0.5 Aqua bid.

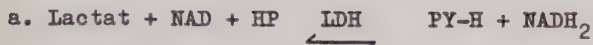
Eichansatz: 0.28 Comix, 0.01 M und 0.01 G.

Start: 0.005 MDH, 0.005 GDH.

⁺ Abkürzung: HP = Hydrazin-Glycin-Puffer
 OA-H = Oxalacetat-Hydrazon
 DAP-H = Dihydroxyacetonphosphat-Hydrazon

LACTAT (L)

Reaktionsablauf:



Reagenzien:

- b. Hydrazinpuffer und NAD: siehe Malat-Test
LDH: siehe ADP-Test.

Metabolitbestimmung am Photometer:

- c. 0.05 NAD, 0.05 Lactat, 0.5 Hydrazinpuffer, 0.5 Aqua bid.
Start mit 0.01 LDH. Ein zweiter Ansatz ist als Blindwert notwendig. Hier wird an Stelle von Lactat Aqua bid. einpipettiert.

Bestimmung der Eichgeraden:

- d. Comix: 0.01 NAD, 0.5 Hydrazinpuffer, 0.5 Aqua bid.
Eichansatz: 0.3 Comix, 0.01 Lactat, Start: 0.005 LDH
Blindwert: 0.3 Comix, 0.01 Aqua bid. Start mit 0.005 LDH.

Metabolitbestimmung im Extrakt:

- e. Comix: siehe unter d.
Meßansatz: 0.05 Extrakt, 0.25 Comix, 0.005 LDH
Blindwert: 0.05 Aqua bid., 0.25 Comix, 0.005 LDH.

Hier erfolgt die Berechnung so, daß der zweite Transmissionswert vom ersten abgezogen wird und dieser Wert dann in die Formel zur Berechnung eingesetzt wird. Dabei ist unbedingt darauf zu achten, daß der Blindwert einigermaßen konstant bleibt. Bei noch so peinlicher Sauberkeit, die für das Arbeiten mit fluorometrischer Technik unerlässlich ist, haben wir immer Verunreinigungen durch Lactat gefunden. Die Beimengen liegen zwar im Bereich von wenigen nM/ml; die fluorometrische Mikrobestimmung von Lactat wird dadurch aber erheblich gestört. Die größte Schwierigkeit bei unserer Lactatbestimmung liegt darin, einen konstanten Blindwert zu erzielen. Wir haben aus diesem Grunde mit Handschuhen gearbeitet und eine Verminderung der Blindwerte bekommen.

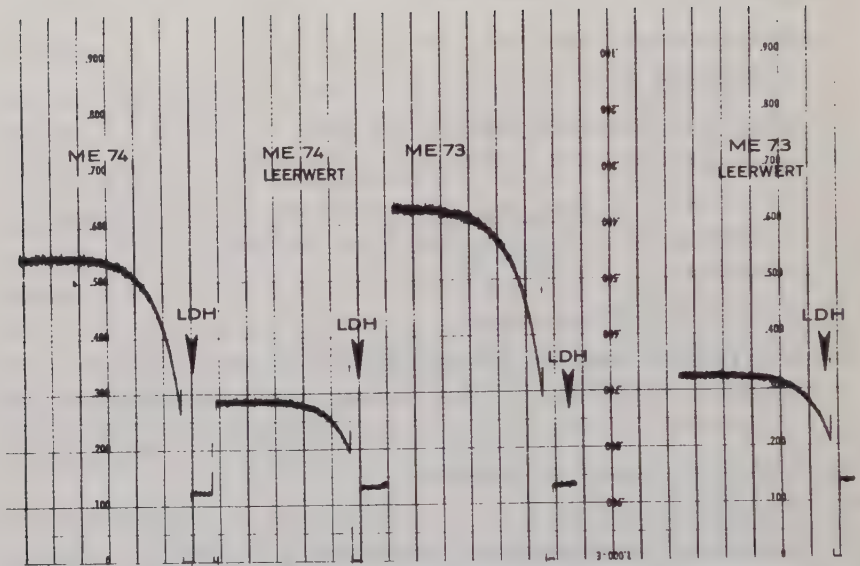
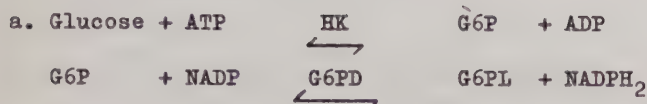


Abb. 11: Beispiel für eine Lactat-Bestimmung. Der Papierstreifen läuft von rechts nach links; der Abstand zweier vertikaler Linien entspricht einer Laufzeit von 2 Minuten. Man beachte, daß die beiden Leerwerte ME 73 und ME 74 ungleich sind.

GLUCOSE

Reaktionsablauf:



Reagenzien:

- b. NADP, G6PD, TRAP : siehe G6P-Test
HK, MgCl_2 : siehe ATP-Test
ATP : siehe ADP-Test

Metabolitbestimmung am Photometer:

- c. 0.05 NADP, 0.1 Glucose, 0.02 MgCl_2 , 0.05 ATP, 0.02 G6PD.
Start mit 0.02 HK. Berechnung wie früher.

Bestimmung der Eichgeraden:

- d. Comix: 0.01 NADP, 0.02 MgCl_2 , 0.02 ATP, 1.0 TRAP.
Eichansatz: 0.28 Comix, 0.02 Glucose, 0.005 G6PD.
Start mit 0.005 HK.

Metabolitbestimmung im Extrakt:

- e. Comix: siehe d.
Meßansatz: 0.05 Extrakt, 0.25 Comix, 0.005 G6PD, Start
mit 0.005 HK. Innerer Standard mit Glucose, aber auch G6P.

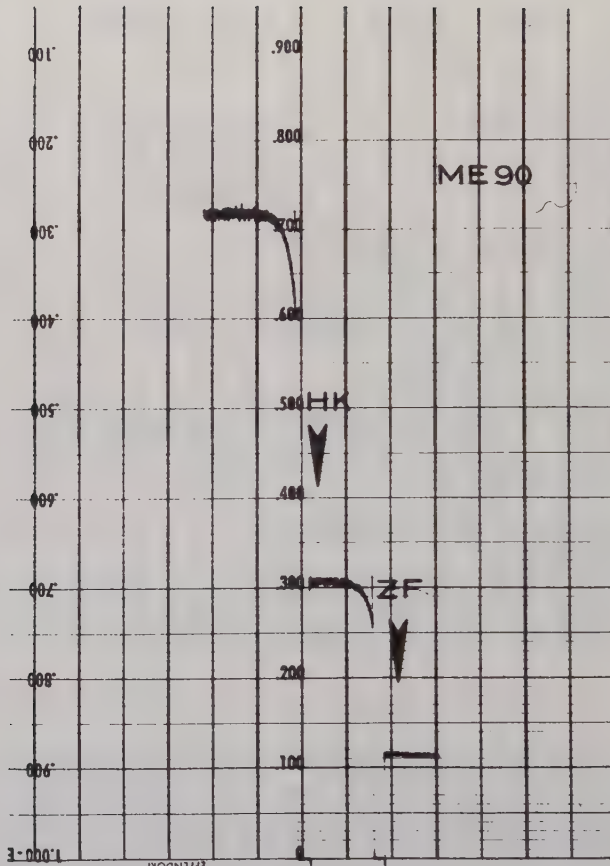
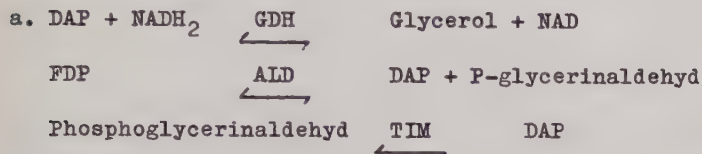


Abb. 12: Beispiel für eine Glucose-Bestimmung mit Extrakt.
Näheres im Text.

DIHYDROXYACETONPHOSPHAT (DAP) und
FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHAT (FDP)

Reaktionsablauf:



Reagenzien:

- b. NADH₂ : siehe PY-Test
GDH : siehe G-Test
Ketose-1-phosphate aldehyd lyase (4.1.2.7)
ALD 15 419 B = 10 mg/ml : 1 : 5 verdünnt.
TIM 15 333 B = 10 mg/ml : 1 : 5 verdünnt.
DAP-DK-C 15 401 B
FDP-Na 15 161 B

Metabolitbestimmung am Photometer:

- c. 0.05 NADH₂, 0.1 DAP, 0.1 FDP, 0.8 TRAP.
Bestimmung von DAP: 0.02 GDH
Bestimmung von FDP: 0.02 TIM/ALD (1:1)

Bestimmung der Eichgeraden:

- d. Comix: 0.025 NADH₂, 1.0 TRAP
Eichansatz: 0.28 Comix, 0.01 DAP, 0.01 FDP
Bestimmung von DAP: 0.005 GDH
Bestimmung von FDP: 0.005 TIM/ALD (1:1)

Bei der Berechnung von c. und d. ist zu berücksichtigen, daß pro Mol FDP zwei Mol DAP entstehen. Die erhaltenen Extinktionswerte bzw. Transmissionswerte müssen somit durch zwei dividiert werden. Ebensolches gilt für e.

Metabolitbestimmung im Extrakt:

- e. Comix siehe bei d.
Meßansatz: 0.1 Extrakt, 0.2 Comix. Start mit 0.005 GDH, dann 0.005 TIM/ALD (1:1).

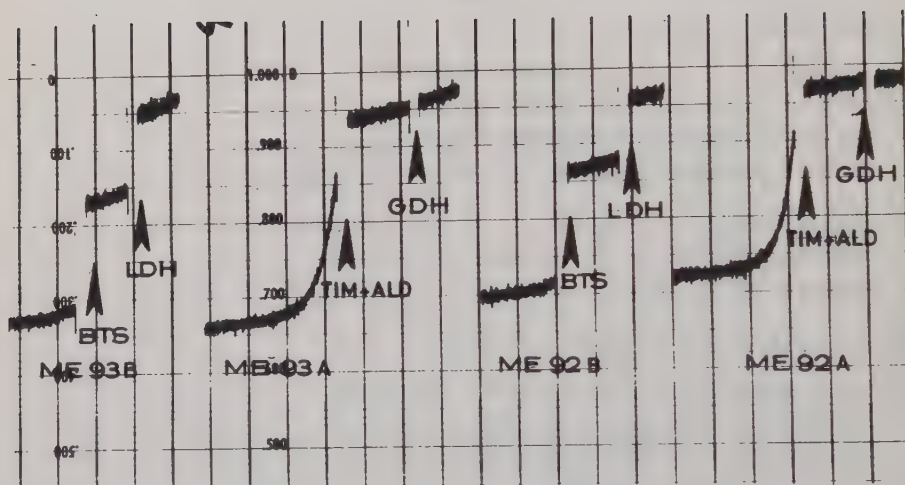


Abb. 13: Beispiel für zwei Bestimmungen von PY, DAP und FDP im Extrakt. Testzusammensetzung siehe S. 35.
Von rechts nach links: Messung von DAP und FDP (ME 92A), Messung von PY mit innerem Standard; entsprechendes Vorgehen mit ME 93A und B.

Tabelle III

Substrate	Zange 1(2,25cm ²)	Zange 2(8,75cm ²)	Werte von Hohorst (g)
ATP	6,75 $\pm$ 0,218(8)	6,35 $\pm$ 0,167(7)	6,09 $\pm$ 0,12(19)
ADP	0,634 $\pm$ 0,157(5)	0,671 $\pm$ 0,115(8)	0,741 $\pm$ 0,024(19)
CP	25,2 $\pm$ 0,767(7)	23,1 $\pm$ 1,29(7)	21,2 $\pm$ 0,800(11)
G6P	0,075 $\pm$ 0,006(17)	0,215 $\pm$ 0,011(13)	0,769 $\pm$ 0,101(24)
F6P	-	0,058 $\pm$ 0,015(11)	0,291 $\pm$ 0,051(10)
FDP	0,024 $\pm$ 0,010(10)	-	0,050 $\pm$ 0,006(25)
DAP	< 0,010 (10)	0,013 $\pm$ 0,004(8)	0,031 $\pm$ 0,003(28)
L	0,729 $\pm$ 0,080(10)	1,25 $\pm$ 0,145(7)	2,06 $\pm$ 0,140(28)
PY	0,057 $\pm$ 0,009(10)	0,102 $\pm$ 0,011(9)	0,097 $\pm$ 0,007(28)
Glucose	1,09 $\pm$ 0,147(6)	1,5 $\pm$ 0,084(10)	2,53 $\pm$ 0,330(6)
L/P	12,8	12,2	21,3

Anmerkung: Metabolitgehalte in $\mu\text{M/gFr}$ mit Standardabweichung;
Zahl der Versuche in Klammern; Näheres siehe Text.

Ergebnisse

In Tabelle III sind die Über-Alles-Gewebsgehalte der ermittelten Metabolitwerte angegeben. Bei den Werten der ersten Spalte wurde eine Frierstopzange von $2,25 \text{ cm}^2$, bei den Werten der zweiten Spalte eine Zange von $8,75 \text{ cm}^2$ benutzt. Die dritte Spalte enthält die von Hohorst angegebenen Werte (8).

Die Werte der energiereichen Phosphate ATP und CP zeigen von der dritten Spalte bis zur ersten Spalte einen stetigen Anstieg. Der Anstieg der Werte ist signifikant. Dagegen zeigen die Ergebnisse der glykolytischen Substrate ein gegensinniges Verhalten. Von der dritten bis zur ersten Spalte ist ein beträchtlicher Abfall der Werte zu erkennen, der alle gemessenen Substrate außer Pyruvat betrifft. Der Pyruvatgehalt wurde nur bei Benutzung der Zange mit der kleinen Fläche vermindert gefunden. Der L/P-Quotient ist in Spalte 1 und 2 gleich, jedoch nur etwa halb so groß wie bei dem methodischen Vorgehen von Hohorst (Spalte 3).

N	9	7	9	7	4
	Äther	Äther N. Isch. Ekt.	Inactin	Inactin N. Isch. Ekt.	Inactin Curare
CP	19,46	21,08*	20,58*	21,27	20,08
C	10,36	8,21	9,07	9,33	8,88
CP+C	29,82	29,30	29,65	30,59	28,96
CP/C	1,88	2,56	2,27	2,28	2,26
ATP	5,92	6,25*	6,45*	6,40	6,77*
ADP	0,68	0,66	0,66	0,71	0,80
AMP	0,089	0,128	0,097	0,094	0,072
AN	6,69	7,04*	7,21	7,20	7,64
ATP/ ADP	8,73	9,43	9,78	9,05	8,45
G-6P	0,79	0,53	0,54*	0,35*	0,37*
Glyk.	28,14	18,43	35,75*	37,31*	37,53*
Gluc.	1,50	2,63	0,96	0,96	1,11
Lac.	2,38	1,53*	1,61*	1,57*	1,57*
Pyr.	0,098	0,073	0,074	0,064	0,068
L/P	24,3	21,1	21,9	24,3	22,9
NH ₃	0,20	-	0,10*	0,14	0,10*

* signifikanter Unterschied gegen den Ätherwert
Werte in $\mu\text{Mol/gF}$.

Tabelle IV: Metabolitgehalte der Beinmuskulatur der Ratte bei unterschiedlichen Narkotika. Das methodische Vorgehen entspricht dem Hohorst'schen Verfahren (8,9). Die Größe der Zange beträgt $8,75 \text{ cm}^2$. In Spalte 1 sind die Ätherwerte aufgetragen: niedrige ATP- und CP-Werte und hohe G6P- und L-Werte. Die Inactinwerte sind in Spalte 3 zu sehen: hohe ATP- und CP-Werte und niedrige G6P- und L-Werte (15).

Diskussion

Bei der Besprechung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß sich die Metabolitgehalte der Muskulatur allein schon bei Reizung derselben oder bei schlechtem Aufschlußverfahren (z.B. zu hohe Temperatur oder zu lange Säureeinwirkung) in charakteristischer Weise verändern: Die energiereichen Phosphate ATP und besonders CP sinken ab, während die glykolytischen Substrate und der L/P-Quotient ansteigen. Davon ausgehend soll im folgenden das Abweichen unserer Methode von dem Vorgehen früherer Untersucher in einzelnen Punkten erörtert werden. Unsere Variationen bestanden in der Benutzung eines anderen Narkotikums, in einer modifizierten Aufarbeitung des Gewebes und der Verwendung zweier verschieden großer Zangen.

Hohorst verwandte in seinen Versuchen Äther, während wir Inactin^R, ein Thiobarbiturat, als Narkotikum gebrauchten. Ein von Kirsten (15) angestellter in Tabelle IV wiedergegebener Vergleich unter Benutzung dieser beiden Narkotika zeigte, daß bei sonst gleichem Vorgehen wie Hohorst die Metabolitgehalte von ATP und CP im Muskel bei Inactinnarkose über den Werten bei Äthernarkose liegen, wogegen die glykolytischen Substrate bei Inactin unter den Ätherwerten liegen. Ähnliche Unterschiede mit beiden Narkosearten sahen wir auch bei Benutzung unserer Mikromethode (Spalte 2 und 3 der Tabelle V). Der Inactinnarkose ist also bei Bestimmung des Ruhestatus der Muskelmetabolite der Vorzug zu geben. Der Einfluß der Mikromethode allein auf den Metabolitstatus ist zu erkennen, wenn man die mit unserer Mikromethode unter Äthernarkose gewonnenen Werte (Spalte 2 Tabelle V) mit den ebenfalls unter Äthernarkose gewonnenen Ergebnissen von Hohorst (Spalte 1 Tabelle V) vergleicht.

Tabelle V

	Werte von Hohorst (Tabelle III)	Werte mit Äther (n = 4)	Werte mit Inactin (Tabelle III)
ATP	6,09	6,2	6,35
CP	21,2	22,2	23,1
G6P	0,741	0,45	0,215
L	2,06	1,6	1,25

Die Werte von ATP und CP sind höher, die Gehalte von G6P und L niedriger als die Ergebnisse von Hohorst.

Für diesen Unterschied ist allein die unterschiedliche Aufschlußmethode verantwortlich, denn das Narkotikum und die Größe der Zange ($8,75 \text{ cm}^2$) sind gleich. Die höheren ATP- und CP-Gehalte und die niedrigeren G6P- und L-Werte dürften durch folgende Vorteile gegenüber dem Hohorst'schen Verfahren bedingt sein:

1. Durch die Anfertigung feiner Gewebeschnitte werden die Enzyme von der Säure schnell inaktiviert und so die weiterlaufenden Stoffwechselvorgänge gebremst.
2. Durch den schnellen und schonenden Gewebsaufschluß mit Hilfe von Ultraschall und die sehr schnelle Neutralisation der Säure wird der Zerfall von empfindlichen Metaboliten verringert. Der hohe Gehalt des sehr empfindlichen CP ist dafür als Anhaltspunkt zu werten.
3. Durch die Schneidetechnik werden die mehr oberflächlichen und die am schnellsten durch den Gefrierstop fixierten Gewebspartien analysiert.

Tabelle V: Metabolitgehalte bei Äther- und Inactinnarkose (Spalte 2 und 3) bei Anwendung der im methodischen Teil beschriebenen Mikromethode im Vergleich zu den Metabolitgehalten bei Äthernarkose nach Hohorst (Spalte 1). Angaben in $\mu\text{M/g}$ Frischgewebe, Zangengröße: $8,75 \text{ cm}^2$.

Besondere Beachtung verdient das Verhalten des I/P-Quotienten. Unser I/P-Quotient von 12.8 bzw. 12.2 stimmt mit den gemessenen Quotienten von Leber, Gehirn, Serum und Schweiß (6,9,10) unter Ruhebedingungen gut überein. Daraus ist zu schließen, daß auch im Muskel der I/P-Raum mit dem Extrazellulärraum im Gleichgewicht steht und ein Wert von 10-12 dem in-vivo-Status nahe kommt.

Schließlich hat noch die Fläche der Gefrierstopzange einen Einfluß auf die Ergebnisse (Spalte 1 und 2 in Tabelle III). Das Narkotikum und die Aufschlußmethode sind völlig analog. Zange 1 hat eine Fixierungsfläche von $2,25 \text{ cm}^2$. Mit dieser viel kleineren Zange ist es möglich, die durch die Präparation irritierten Muskelpartien nahe dem Medianschnitt zu meiden und mehr lateral Gewebe zu entnehmen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen einen weiteren Anstieg der energiereichen Phosphate ATP und CP und einen deutlichen Abfall der glykolytischen Substrate. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist nur die unterschiedliche Zange zu berücksichtigen. Wenn mit dieser kleinen Zange Gewebe nahe dem Medianschnitt entnommen wurde, so entsprachen die erzielten Substratgehalte denen der Zange 2, so daß die Entnahme des Muskelgewebes weiter lateral und entfernt den am stärksten irritierten Muskelpartien für die niedrigen bzw. hohen Gehalte verantwortlich ist.

Bei der Betrachtung der Glucose-Werte in Tabelle III endlich ist zu bedenken, daß Glucose nur in geringen Mengen intrazellulär vorkommt und der Hauptteil des gemessenen Gehaltes auf den extrazellulären Anteil entfällt. So ist der höhere Wert bei Benutzung einer größeren Zange (Spalte 2 der Tabelle III im Vergleich zu Spalte 1) durch Reizung der Muskulatur und der noch höhere bei der Hohorst-Methode (Spalte 3 der Tabelle III) durch die Äthernarkose erklärbar. Äthernarkose führt zu einer beträchtlichen Hyperglykämie und außerdem zu einer Senkung des Glykogengehaltes. Letzteres ist auch bei Reizung der Muskulatur zu beobachten.

Zusammenfassung

Es wird eine Mikromethode zur Analyse von glykolytischen und energiereichen Substraten im Muskelgewebe beschrieben. Diese umfaßt einen Gefrierstop, die Anfertigung 10-20 μ dünner Schnitte in einem Kryostaten und deren Aufschluß mit Hilfe von Ultraschall. Die Metabolitanalyse geschieht fluorometrisch. Die Testzusammensetzung wird für folgende Substrate beschrieben: G6P, GLP, F6P, FDP, DAP, G, M, L, PY, ATP, ADP, AMP, CP und Glucose. Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die Werte der energiereichen Substrate ATP und CP wenig über den bisherigen Ergebnissen liegen, die der glykolytischen Metabolite jedoch weit unter den früher gemessenen Werten. Der aus den Gehalten von L und PY berechnete L/P-Quotient beträgt etwa 12 und liegt damit nahe den Quotienten anderer Organe und Flüssigkeiten. Die niedrigen Gehalte glykolytischer Substrate und der L/P-Quotient weisen darauf hin, daß die beschriebene Mikromethode dazu beiträgt, der Erfassung des Status in vivo näherzukommen.

Zusammenfassend bietet die beschriebene Methode folgende Vorteile:

1. Der Gewebebedarf für eine Metabolitanalyse von 15 Substraten beträgt etwa 30-40 mg. Bei den bisherigen Verfahren brauchte man ungefähr 1 g.
2. Mit Hilfe der Schneidetechnik werden die Enzyme schon vor dem eigentlichen Aufschluß mit Ultraschall inaktiviert, da die Säure die dünnen Schnitte schnell durchdringen kann und so die weiterlaufenden Stoffwechselprozesse gebremst werden.
3. Das untersuchte Gewebe kann histologisch untersucht, die Beimengung unerwünschter Gewebselemente festgestellt und mit Hilfe besonderer Technik entfernt werden.

Literaturverzeichnis

1. Arese, P., R. Kirsten und E. Kirsten:
Metabolitgehalte und -gleichgewichte nach tetanischer Kon-
traktion des Taubenbrustmuskels und des Rattenskelettmuskels:
Biochem. Z. 341, 523 (1965)
2. Bergmeyer, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse, Darmstadt:
Verlag Chemie 1962
3. Bücher, Th. und M. Klingenberg:
Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation:
Angew. Chem. 70, 552 (1958)
4. Bücher, Th. und W. Rüssmann:
Gleichgewicht und Ungleichgewicht im System der Glykolyse:
Angew. Chem. 75, 881 (1963)
5. Dubach, U.C.:
Quantitative Histochemie der Niere:
Klin. Wschr. 41, 157 (1963)
6. Emrich, H.M., R.K.H. Zwiebel:
Veränderungen des Lactat-Pyruvat-Quotienten im menschlichen
Schweiß bei verschieden starkem Schwitzen:
Pflügers Archiv 290, 315 (1966)
7. Hess, B.:
Koordination von Glykolyse und Atmung: Funktionelle und
morphologische Organisation der Zelle: Wissenschaftliche
Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte
in Rottach-Egern 1962, Springer-Verlag 1963
8. Hohorst, H.J.:
Metabolitgehalte und Metabolitgleichgewichte in der querge-
streiften Muskulatur der Ratte;
Habilitationsschrift 1962, Marburg

9. Hohorst, H.J., F.H. Kreutz, Th. Bücher:
Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen in der
Leber der Ratte: Biochem. Z. 332, 18 (1959)
10. Lowry, O.H., J.V. Passonneau, F.X. Hasselberger and D.W. Schulz:
Effect of Ischemia on Known Substrates and Cofactors of the
Glycolytic Pathway in Brain: J. Biol. Chem. 239, 18 (1964)
11. Lowry, O.H., J.V. Passonneau and M.K. Rock:
The Stability of Pyridine Nucleotides, J. Biol. Chem. 236,
2756 (1961)
12. Lowry, O.H. and J.V. Passonneau:
The Relationship between Substrates and Enzymes of Glycolysis
in Brain, J. Biol. Chem. 239, 31 (1964)
13. Lowry, O.H., J.V. Passonneau, D.W. Schulz and M. Rock:
The Measurement of Pyridine Nucleotides by Enzymatic Cycling,
J. Biol. Chem. 236, 2746 (1961)
14. Kirsten, E., R. Kirsten, P. Arese:
Das Verhalten der freien Aminosäuren, energiereichen Phospho-
säureverbindungen und einigen Glykolyse- und Tricarbonsäure-
cyclus-Substraten in Muskeln von *Locusta migratoria* bei der
Arbeit: Biochem. Z. 337, 167 (1963)
15. Kirsten, R.:
Persönliche Mitteilung
16. Seraydarian, K., Mommaerts, W.F.H.M. and Wallner, A.:
Enzymatic Fluorometric Methods for the Microdetermination
of Hexose Phosphate in Muscle. J. Biol. Chem. 235, 2191 (1960)
17. Wollenberger, A., O. Ristau, G. Schoffa:
Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größe-
rer Gewebestücke:
Pflügers Archiv ges. Physiologie 270, 399 (1960)

18. Wollenberger, A., E.G. Krause, B.E. Wahler:
Über den tatsächlichen Orthophosphat- und N-Phosphoryl-
Creatingehalt des Säugetierherzens.
Pflügers Archiv ges. Physiologie 270, 413 (1960)
19. Udenfriend, S.:
Fluorescence Assay in Biology and Medicine,
Academic Press, London - New York 1962
20. Zwiebel, R. und R. Kirsten:
Eine Untersuchung zum "in vivo" Status der Metabolitspiegel
in der Rattenskelettmuskulatur: Bericht über die 31. Tagung
der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Pflügers Archiv
ges. Physiologie 289, 37 (1966)

Herrn Prof. Ullrich danke ich für die Überlassung des Themas
und für die Durchsicht des Manuskriptes, Herrn Dr. Kirsten für
die sachliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Lebenslauf

Am 12.2.1942 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Heinz Zwiebel und seiner Frau Ilse in Berlin geboren. Von 1948 bis 1954 besuchte ich die 2. Grundschule in Berlin-Lankwitz, von 1954 bis 1961 die Tannenbergsschule in Berlin-Lichterfelde. Von Juli 1958 bis August 1959 verbrachte ich ein Jahr als Austauschschüler des Michigan Council of Churchess in Michigan, USA. Im Jahre 1961 bestand ich das Abitur an der Tannenbergsschule und begann im gleichen Jahr mein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin. Im April 1962 absolvierte ich das Vorphysikum, im März 1964 das Physikum. Nachdem ich im Sommersemester 1964 in Kiel studierte, begann ich im November des gleichen Jahres meine Doktorarbeit am Physiologischen Institut bei Prof. Ullrich. Ich beendete die Arbeit im Oktober 1965 und widmete mich dann ganz dem klinischen Studium. Im Wintersemester 1965/66 studierte ich in Göttingen. Seit dem Sommersemester 1966 belegte ich wieder in Berlin und bestand das medizinische Staatsexamen am 13. September 1967.

